

世界でいちばんつよい菌-放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* の紫外線誘発DNA損傷修 復戦略-

著者	田中 将志
号	45
学位授与番号	1970
URL	http://hdl.handle.net/10097/38980

氏名・(本籍)	たなかまさし 田 中 将 志
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	理博第1970号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科, 専攻	東北大学大学院理学研究科(博士課程)生物学専攻
学位論文題目	世界でいちばんつよい菌—放射線抵抗性細菌 <i>Deinococcus radiodurans</i> の紫外線誘発DNA損傷修復戦略—
論文審査委員	(主査) 教授 山本和生 教授 渡辺 彊 助教授 布柴達男

論文目次

要旨	pp1
序論	pp2～5
材料と方法	pp6～11
結果	pp12～23
考察	pp24～34
謝辞	pp35
参考文献	pp36～40

論文内容要旨

目的

それは1つの缶詰から始まった。放射線を当てて殺菌してあるはずなのに、缶詰の肉が腐っていたのである。放射線を当てられても生き残り、肉を腐らせたのは何か。こうして単離されてきたのが、放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* であった。

D. radiodurans は紫外線 (ultraviolet light, UV) の主な生物作用である致死作用、突然変異誘発作用に対し、高い耐性を示す。致死作用に関しては、大腸菌の20倍も強い。突然変異に関しては、まったく誘発されないと報告されてきた。UVの致死作用及び突然変異誘発作用は、UV誘発DNA損傷を主因とする。故に本細菌は、他生物のもの以上に効率的で正確なDNA修復系を有すると考えられてきたのである。しかしながらその実体は依然として明らかでない。従って本研究の目的は、本細菌のUV誘発DNA損傷修復機構を明らかにすることで、そのUV耐性機構を解明することである。

方法

UVによりさまざまなDNA損傷が誘発されるが、そのうちの70～80%はシクロブタンピリミジン二量体 (cyclobutane pyrimidine dimer, CPD), 20～30%は6-4付加体 (pyrimidine [6-4] pyrimidone photoproduct, 6-4PP) であり, 両損傷とも複製や転写を阻害する。このため, UVの生物作用とそれに対する防御機構を考えたとき, 生命はいかにしてCPD及び6-4PPを修復するかが重要な問題となる。

近年完了した本細菌のゲノムDNA解読の結果は, CPD, 6-4PP修復系の候補として, 他生物と同様の修復系の存在を示唆した。すなわち, 大腸菌の組換えタンパク質RecA, 分裂酵母の除去修復タンパク質UVDE, 大腸菌のヌクレオチド除去修復タンパク質UvrAをコードする遺伝子のホモログ, *recA*, *uvde*, *uvrA1*遺伝子がみつめられたのである。この事実が意味するのは, 進化の歴史の中で多くの生物間で保存されてきているこれらの修復系は, 生物種によらず, CPDや6-4PPを修復するにあたり非常に効果的な機構であるという可能性である。故に, RecA系, UVDE系, UvrA1系は*D. radiodurans*のUV耐性機構においても重要であると予想した。ゲノムDNA解読の結果はさらに, 他生物とは異なって, 本細菌には*uvrA*ホモログがもう1つあることを示した (*uvrA2*遺伝子)。従って, RecA系, UVDE系, UvrA1系, UvrA2系からなる層の厚い修復系が, 本細菌のUV耐性に大きな役割を果たすと考えた。そこで, RecA系, UVDE系, UvrA1系, UvrA2系それぞれを破壊した菌株を作製し, これらの菌株を用い, 次の3点について解析した。

- 1)まず, UVの致死作用の抑制に対し, 各系はどの程度寄与するのかを明らかにするため, 各菌株のUVに対する生存率を調べた。
- 2)次に, 突然変異誘発に対する各系の抑制効果を明らかにするため, 各菌株のUV誘発突然変異頻度を調べた。この場合, まず, 次の事実注目した。それは, 従来の研究において用いられてきた突然変異体検出系には1つの大きな課題があるということである。検出できる突然変異のタイプに限りがあるのである (塩基置換, それに限られた部位に生じたものしか検出できない)。そこで, 塩基置換のみならず, どのような突然変異を生じた場合でも, その変異体を検出できる系を新たに確立し, これを用いて突然変異誘発頻度を求めた。
- 3)さらに, 各除去修復系の損傷除去能力を明らかにするため, CPD及び6-4PPそれぞれに対する抗体を用い, 除去修復系関連遺伝子欠損株におけるCPD, 6-4PPそれぞれの除去効率を解析した。

結果と考察

まず, *recA*-株においては, 野生株に比べてUV感受性が増大し, 突然変異も高頻度に誘発された。従って, 組換え修復RecA系は, UVの致死作用も突然変異誘発作用も効果的に抑制できることが明らかとなった。

一方, 除去修復系欠損株の場合, *uvde*-株及び*uvrA1*-株は野生株よりもUVにわずかに感受性となり, *uvde-uvrA1*-株はさらに高い感受性を示した。また, 突然変異誘発についても, UVDE系とUvrA1系をともに破壊された菌株では突然変異頻度が高くなった。ただし, *uvrA2*遺伝子を破壊しても, 生存率や突然変異頻度に変化はみられなかった。従って, UV防御に大きく関わる除去修復系はUVDE系とUvrA1系であり, これらは互いに独立に働き, バックアップとなることが示された。さらに, 各除去修復系のCPD除去効率, 6-4PP除去効率を解析した結果, UVDE系及びUvrA1系は効率的に両損傷を除去すること, UvrA2系はUvrA1系の6-4PP除去を促進すること, そして*uvde-uvrA1*-株においても, CPDも6-4PPも除去されることが明らかとなった。従って, UVDE系やUvrA1系以外の新たな損傷除去機構の存在が見出された。

以上より, 本細菌のUV耐性獲得において重要な役割を果たすのは, 1)他生物と同様の組換え修復系及び除去修復系が損傷を修復すること, 2)他生物にはみつめられない特有の損傷除去機構が機能すること, これら2点であると結論した。

論文審査の結果の要旨

放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* は、放射線に強い抵抗性を示す最近である。例えば紫外線に対しては大腸菌の約20倍、 γ 線に対しては大腸菌の約200倍抵抗性である。このことから、遺伝物質であるDNAに生じた傷を、効率的に修復する未知の機構を持っていることが示唆されてきた。

田中将志は、*D. radiodurans*の紫外線抵抗性の仕組みを理解するために、本細菌のゲノムDNA解読の結果をもとに、組換え修復RecA系、除去修復UVDE系、UvrA1系、UvrA2系の4つのDNA修復系に着目した。これらの系に関する破壊株を作製し、各菌株の紫外線に対する応答を調べることで、組換え修復系及び除去修復系の紫外線防御への寄与を解析した。まず、*recA*⁻株においては、野生株に比べて紫外線感受性が増大し、突然変異も高頻度に誘発された。従って、組換え修復RecA系は、紫外線の致死作用も突然変異誘発作用も効果的に抑制できることが明らかとなった。一方、除去修復系欠損株の場合、*uvrA1*⁻株及び*uvrA1*⁻株は野生株よりも紫外線にわずかに感受性となり、*uvrA1*⁻株はさらに高い感受性を示した。また、突然変異誘発についても、UVDE系とUvrA1系をともに破壊された菌株では突然変異頻度が高くなった。*uvrA2*遺伝子を破壊しても、生存率や突然変異頻度に変化はみられなかった。従って、紫外線防御に大きく関わる除去修復系はUVDE系とUvrA1系であり、これらは互いに独立に働き、バックアップとなることが示された。さらに、各除去修復系の損傷除去能力を解析した結果、UVDE系及びUvrA1系は効率的に損傷を除去すること、UvrA2系はUvrA1系の損傷除去を促進すること、そして*uvrA1*⁻株においても損傷が除去されることが明らかとなった。従って、本細菌はUVDE系やUvrA1系以外にも損傷を除去する新規の機構を有すると結論した。

本論文で田中将志は、RecA、UVDE、UvrA1系が紫外線損傷修復に大きく関与すること、UvrA2はあまり関わらないこと、さらにこれとは別に、新規の修復機構が存在する可能性を示した。これらの成果は自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を備えていることを示している。従って、田中将志提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。